

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 813 314**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **00 10962**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 N 15/01, C 12 N 15/11, C 07 H 21/00, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.08.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 01.03.02 Bulletin 02/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *BIOMETHODES Société à responsabilité limitée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : DELCOURT MARC et BLESIA STE-PHANE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CASALONGA ET JOSSE.

⑤4 PROCÉDE DE MUTAGENÈSE DIRIGÉE MASSIVE.

⑤7 La présente invention a pour objet un procédé de mutagenèse d'un gène cible du type consistant à préparer une série de N oligonucléotides de séquence substantiellement complémentaire d'au moins une région du gène cible, avec N supérieur à 5, puis à faire réagir ladite série d'oligonucléotides avec ledit gène cible dans des conditions permettant la production de copies du gène cible portant au moins une mutation, caractérisé en ce que chaque oligonucléotide présente une séquence complémentaire d'une région différente du gène cible et au moins une mutation placée au centre de la séquence de l'oligonucléotide, l'ensemble desdits oligonucléotides de la série couvrant tout ou partie de la séquence dudit gène cible, et en ce que l'on fait réagir ladite série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase de façon à générer une banque de gènes mutés où chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente en moyenne dans plus de 1/N des gènes de la banque.

FR 2 813 314 - A1



PROCÉDÉ DE MUTAGENÈSE DIRIGÉE MASSIVE.

La présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire et plus particulièrement celui de la mutagenèse. Elle a pour objet un procédé de mutagenèse dirigée à haut débit, c'est-à-dire la constitution de nombreux mutants dirigés en un temps et un nombre d'étapes réduits. Ce procédé sera donc qualifié « mutagenèse massive ».

La mutagenèse est une technique visant à modifier artificiellement la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN dans le but de modifier l'activité biologique qui en découle. La mutagenèse a pris cette dernière décennie une place importante dans de nombreux travaux de biologie moléculaire.

Le terme de mutagenèse peut être associé à trois modifications distinctes d'un fragment d'ADN :

- la délétion, qui consiste à éliminer des nucléotides du fragment d'ADN d'intérêt,
- l'insertion, qui consiste à en rajouter, et
- la substitution, qui consiste à remplacer une ou plusieurs bases par un même nombre de bases de nature différente.

Les techniques de mutagenèse peuvent être séparées en deux grands groupes : la mutagenèse aléatoire d'une part, et la mutagenèse dirigée d'autre part.

La mutagenèse aléatoire vise à introduire des substitutions de nature et de position aléatoire dans un fragment d'ADN. Historiquement, la mutagenèse aléatoire était réalisée au moyen de procédés chimiques altérant la structure de l'ADN. Plus récemment, l'amplification d'une molécule en utilisant une polymérase dans des conditions particulières a souvent remplacé les procédés chimiques. Ces conditions particulières sont caractérisées en ce qu'elles altèrent les capacités de l'enzyme à répliquer fidèlement l'ADN. Celle-ci introduit au fil des cycles des mutations, c'est-à-dire des différences par rapport à la séquence

initiale. À la fin de la réaction, un grand nombre de copies de la molécule initiale sont obtenues, chacune de ces molécules comportant des mutations différentes. Ces molécules sont présentes sous forme d'une banque, c'est-à-dire d'un mélange de molécules de nature différente (différant par la nature et la position de leurs mutations).

La mutagenèse dirigée vise à introduire une ou quelques mutations (substitutions, mais aussi délétions ou insertions) de nature et de position connue dans un fragment d'ADN. Un oligonucléotide est utilisé pour introduire cette mutation. Cet oligonucléotide est classiquement constitué d'une vingtaine de bases. La séquence de cet oligonucléotide est homologue en tout point à la séquence ciblée sur le fragment d'ADN à l'exception d'une ou de quelques positions localisées dans sa partie médiane.

Cet oligonucléotide est ensuite utilisé pour amorcer une réaction de répllication (ou d'amplification, c'est-à-dire de multiples réplifications) en utilisant le fragment d'ADN comme matrice. La séquence nouvellement synthétisée contient la modification recherchée.

Les premières techniques de mutagenèse dirigée étaient basées sur l'amplification du seul fragment d'ADN d'intérêt (sous la forme d'un fragment d'ADN linéaire), qui devait ensuite être introduit dans un plasmide. Ces techniques étaient fastidieuses et devaient être adaptées à chaque système d'étude.

Plus récemment, l'oligonucléotide mutant a été utilisé pour répliquer directement le plasmide contenant le fragment d'ADN d'intérêt. Le nombre de manipulations à réaliser est ainsi minimisé.

La réalisation pratique de la mutagenèse dirigée est cependant loin d'être simple. Se pose notamment le problème de l'isolement des molécules ayant incorporé la mutation par rapport aux molécules ne l'ayant pas incorporée. La seule répllication d'un fragment d'ADN circulaire (correspondant au cas classique d'un gène cloné dans un plasmide) au moyen d'un oligonucléotide mutant ne

permet pas, en l'absence de système de sélection, d'observer un taux de mutagenèse détectable. L'ADN synthétisé *in vitro* pouvant être distingué de l'ADN synthétisé dans des bactéries sur le critère de son contenu en bases méthylées, un système de criblage basé sur ce critère a été mis au point et généralisé. Il s'agit d'utiliser l'enzyme DpnI, spécifique de sites présents sur l'ADN méthylé mais pas sur l'ADN non méthylé (Lacks et al., 1980, Methods in Enzymology, 65 :138). Les molécules n'ayant pas subi de répllication *in vitro* sont ainsi éliminées. Mais même en utilisant ce système de criblage de mutants, l'efficacité de la réaction de mutagenèse reste faible et voisine de 5% seulement de molécules mutantes.

Ce faible taux de mutants est notamment dû au fait qu'à l'issue de la réaction de mutagenèse dirigée, les molécules circulaires sont introduites dans des bactéries contenant un système de réparation de l'ADN qui élimine une grande partie des mutations si celles-ci ne sont portées que par l'un des brins d'ADN.

De nombreux systèmes ont été proposés pour tenter d'améliorer l'efficacité de ces techniques de mutagenèse. Ces techniques nécessitent le plus souvent un second oligonucléotide permettant d'améliorer la fréquence des molécules mutantes avant criblage (Brevet EP 96942905 ; Brevet WO 9935281). D'autres systèmes utilisent également un second oligonucléotide permettant un système de criblage particulier et parfois plus efficace (Brevet EP 0938552, Catalogue Clontech 2000, page 45). Enfin d'autres systèmes utilisent des souches bactériennes particulières, ces systèmes ayant pour objet de minimiser la déperdition de rendement due à l'activité réparatrice des bactéries (Brevet US 4,873,192 ; Brevet EP 0938552).

Enfin, la plupart des techniques existantes permettent d'intégrer simultanément plusieurs oligonucléotides dans une séquence d'ADN. En règle générale, jusqu'à trois oligonucléotides ont pu être introduits simultanément en différents lieux du fragment à muter

(Brevet WO 9935281 ; Brevet EP 0938552). Un article fait même référence à l'obtention de molécules ayant simultanément intégré jusqu'à sept oligonucléotides en une seule étape (Perlak et al., 1990, Nucleic Acid Research, 18 :7457).

La notion de banque n'est pas, dans la technique selon l'art antérieur, adaptée pour caractériser les produits obtenus à l'issue d'une réaction de mutagenèse dirigée. En effet, dans la grande majorité des cas, un seul produit est obtenu à l'issue de la réaction, contenant une seule mutation. Dans les cas où plusieurs mutations sont introduites simultanément au moyen de plusieurs oligonucléotides (Brevet WO 9935281 ; Perlak et al., 1990, Nucleic Acid Research, 18 :7457), les seuls produits recherchés sont ceux ayant incorporé la totalité des mutations, et la technique tend à être optimisée dans l'objectif de maximiser la fréquence de ces produits. Les produits n'ayant incorporé qu'une petite fraction des mutations sont minimisés et sont dans ces rapports considérés comme des produits secondaires.

La mutagenèse peut avoir pour but le gain ou la perte d'une activité.

Le gain d'une activité, ou plus fréquemment sa simple amélioration, est particulièrement intéressante dans les domaines de l'enzymologie ou de l'association ligand/récepteur. Ainsi, pouvoir disposer d'une enzyme d'activité améliorée peut permettre de réduire les coûts de procédés industriels utilisant ces enzymes. De même, l'affinité de la liaison entre un ligand et son récepteur peut être améliorée grâce à quelques mutations localisées au niveau du site de reconnaissance de l'un par l'autre.

La recherche de ces améliorations d'activité est souvent désignée de façon générique par « évolution moléculaire ». Il s'agit de simuler l'évolution lors de réactions *in vitro*, en introduisant des mutations dans un fragment d'ADN et en sélectionnant ceux ayant des activités

améliorées. Plusieurs tours de mutagenèse/sélection miment ainsi l'évolution d'une molécule en présence d'une pression sélective.

Le type de mutagenèse utilisé le plus fréquemment dans ce contexte est la mutagenèse aléatoire. En effet, aucun élément ne permettant généralement de définir a priori la nature et la position des changements susceptibles d'apporter une amélioration de l'activité étudiée, il est nécessaire dans ce contexte de produire un grand nombre de molécules ayant chacune des mutations de position et de nature différentes, afin de maximiser les chances que parmi elles se trouve une molécule correspondant à une activité améliorée.

La perte de l'activité biologique associée à un fragment d'ADN ayant été soumis à mutagenèse apporte des informations particulières sur les acides aminés supportant son activité. Ainsi, si la modification d'un acide aminé entraîne la perte de l'activité biologique, il est probable que cet acide aminé intervienne dans la constitution du site actif supportant cette activité biologique. Ces résultats doivent cependant être considérés avec beaucoup de nuances : il est par exemple possible que cet acide aminé n'intervienne pas directement dans le site actif de l'activité biologique, mais qu'il prenne part à des activités annexes, comme l'adressage intracellulaire de la protéine par exemple. D'autre part, il est possible que la modification introduite déstabilise l'ensemble de la protéine, l'effet de la substitution introduite étant alors indirect et non direct. Pour ces deux raisons, il est important de savoir reconnaître sur un gène codant pour une protéine les motifs supportant les activités d'adressage, de localisation membranaire, de liaison de cofacteurs... D'autre part, il est essentiel que les modifications introduites induisent le moins de déstabilisation possible de la protéine. Le plus souvent, ce sont de petits acides aminés hydrophobes, l'Alanine ou la Valine, qui sont introduits en substitution des acides aminés d'origine. Ces petits acides

aminés sont connus pour conserver la majorité des structures secondaires protéiques (Hélice α ou feuillet β), et donc pour minimiser les déstabilisations globales des protéines.

Les travaux menés dans ce domaine impliquent la création d'un grand nombre de mutants ponctuels portant chacun une substitution différente d'un acide aminé de la protéine par une alanine. Ces travaux nécessitent une somme de travail très importante, chaque mutant devant être réalisé indépendamment.

Il existe des exceptions aux cas généraux présentés ci-dessus. La mutagenèse dirigée a été utilisée dans le contexte de la recherche d'un gain d'activité. Dans le cas où la région du site actif est bien connue, on peut en effet espérer que la modification dirigée des acides aminés le constituant est susceptible d'entraîner une amélioration de l'activité. Ainsi, il est proposé dans le brevet européen No. 527 809 de remplacer séquentiellement les acides aminés d'une région active par un acide aminé fréquemment impliqué dans les sites actifs (la sérine par exemple) en utilisant une technique apparentée à la mutagenèse dirigée. Cette technique présuppose cependant de disposer d'informations précises concernant le site actif de la molécule étudiée, et utilise une technologie ne permettant pas d'introduire un grand nombre de modifications sur un fragment d'ADN.

A l'inverse, des expériences de mutagenèse aléatoire ont été menées dans un contexte de recherche de perte d'activité (Loeb et al., 1989, Nature, 340 :397). Dans ce cas, de très nombreux clones doivent être analysés pour obtenir des résultats concordants et ainsi s'affranchir des limites posées par le remplacement aléatoire.

La présente invention est une technique intermédiaire entre la mutagenèse dirigée et la mutagenèse aléatoire. En effet, son objet n'est pas comme dans le cas de la mutagenèse dirigée simple d'obtenir un seul produit en fin de réaction contenant la ou les mutations souhaitées,

mais d'obtenir un mélange de molécules contenant chacune une ou plusieurs des mutations désirées. L'objet du procédé objet de la présente invention n'est pas non plus d'introduire au niveau d'une position donnée n'importe quelle substitution, comme dans le cas de la mutagenèse aléatoire, mais au contraire d'y introduire un type de substitution particulier et prédéfini.

Ce procédé combine ainsi les avantages de la mutagenèse dirigée (contrôle de la nature des modifications obtenues en une position donnée), et de la mutagenèse aléatoire (obtention d'un grand nombre de mutations différentes réparties sur de nombreuses positions du fragment d'ADN à muter). Il permet de réaliser en un temps très court un grand nombre de mutations dirigées.

Ces buts sont atteints selon l'invention grâce à un procédé de mutagenèse d'un gène cible du type consistant à préparer une série de N oligonucléotides de séquence substantiellement complémentaire d'au moins une région du gène cible, avec N supérieur à 5, puis à faire réagir ladite série d'oligonucléotide avec ledit gène cible dans des conditions permettant la production de copies du gène cible portant au moins une mutation, caractérisé en ce que chaque oligonucléotide présente une séquence complémentaire d'une région différente du gène cible et au moins une mutation placée au centre de la séquence de l'oligonucléotide, l'ensemble desdits oligonucléotides de la série couvrant tout ou partie de la séquence dudit gène cible, et en ce que l'on fait réagir ladite série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase de façon à générer une banque de gènes mutés où chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente en moyenne dans moins de 1/5 des gènes de la banque.

Le procédé de l'invention est remarquable en ce que la contrainte liée à la position de la mutation et celle liée à sa nature sont dissociées ; il est par exemple possible de réaliser des mutations d'un type particulier

(par exemple n'importe quel codon vers Alanine) sur toute une séquence codante. Dans cet exemple, chacun des mutants obtenus en fin de réaction contient une ou plusieurs mutations de nature connue (codon alanine), mais de position non connue. A l'inverse, le procédé de l'invention permet d'incorporer sur quelques positions particulières des oligonucléotides contenant des bases dégénérées. Dans cet exemple, les positions sont relativement connues (le nombre de positions est limité), et la nature des mutations introduites est inconnue.

Ces caractéristiques contrastent par rapport aux techniques de mutagenèse aléatoire, où ni la nature ni la position des mutations ne sont connues, et la mutagenèse dirigée classique, où la nature et la position de la mutation introduite sont connues.

Le procédé de l'invention est également remarquable par le fait qu'à l'issue de la réaction de mutagenèse, on dispose d'un grand nombre de molécules d'ADN différentes, constituant donc une banque. Ces molécules correspondent à toutes les molécules d'ADN ayant incorporé au moins une mutation au niveau des sites préalablement pointés. Le nombre de molécules mutantes différentes est très important car toutes les combinaisons de mutations sont possibles.

Selon une forme avantageuse de réalisation du procédé de l'invention, N est compris entre environ 5 et 10^6 et de préférence entre 50 et 500, et chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente en moyenne dans entre $1/5$ et $1/10^6$ et de préférence entre $1/50$ et $1/500$ des gènes de la banque.

Le procédé de l'invention envisage tout particulièrement le cas où la série d'oligonucléotides comprend N oligonucléotides différents et où chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente dans en moyenne environ $1/N$ des gènes de la banque, avec N ayant la valeur ci-dessus.

Cette caractéristique distingue le procédé de l'invention de l'art antérieur, où les exemples de mutagenèse multiple utilisant simultanément plusieurs oligonucléotides sont au contraire basées sur des taux d'incorporation de chaque oligonucléotide supérieur à 75%. En effet, ces approches ont pour but d'isoler uniquement le mutant ayant incorporé tous les oligonucléotides, et les taux d'incorporation élevés permettent facilement de parvenir à ce but. Au contraire, dans le procédé selon l'invention, la fréquence de mutation au niveau de chacune des mutations à introduire est contrôlée de façon à ne pas obtenir de molécules d'ADN contenant un trop grand nombre de mutations. L'objectif est de disposer de mutants contenant chacun une mutation ou une combinaison de quelques mutations différentes. Pour ce faire, le ratio entre la quantité de chaque oligonucléotide mutant et la quantité de matrice à muter doit être contrôlé. Ce ratio est compris entre 0,01 et 100, et préférentiellement entre 0,1 et 10 selon les cas.

La réaction entre la série d'oligonucléotides avec le gène cible peut être réalisée avec différents types de polymérase, avantageusement thermostables. Un premier mode de réalisation consiste à utiliser une polymérase ayant une activité de déplacement de brin comme la Pfu polymérase, ou une activité 5' exonucléasique comme la Taq polymérase. Dans ce mode de réalisation, la réaction peut comprendre la présence d'une ligase. Un second mode de réalisation consiste à utiliser une polymérase n'ayant pas d'activité de déplacement de brin ou 5' exonucléasique comme la T4 polymérase, et dans ce cas la réaction est réalisée en l'absence de ligase.

Les oligonucléotides de la série ont une taille comprise entre 10 et 100 et de préférence entre 15 et 25 nucléotides. Chacun d'entre eux est homologue d'une partie de la séquence d'ADN à muter, à l'exclusion d'une ou de quelques positions localisées dans sa partie interne, qui

constituent la ou les mutations à introduire. Ces oligonucléotides peuvent être chevauchants, c'est à dire comprendre des séquences communes de deux régions différentes adjacentes. Les oligonucléotides sont
5 préférentiellement tous de même orientation, de façon à ce qu'un seul brin du gène cible soit répliqué, ce qui permet d'obtenir un taux de mutagenèse faible.

Dans un mode de réalisation particulier, les oligonucléotides sont reconstruits à partir de deux
10 oligonucléotides, selon le procédé décrit dans le brevet US5858731.

Avantageusement, chaque oligonucléotide comprend 1 ou plus mutation(s) et de préférence de 1 à 3 mutation(s) placée(s) au centre de sa séquence.

Lesdites mutations de chaque oligonucléotide peuvent être choisies parmi des délétions et/ ou des insertions de un ou plusieurs nucléotide(s).
15

Une forme particulière de mutations consiste à utiliser des oligonucléotides dégénérés. C'est-à-dire que chaque oligonucléotide de la série est présent en plusieurs exemplaires, chaque exemplaire possédant un nucléotide différent au niveau de la ou desdites mutation(s).
20

Une autre forme particulière de mutation consiste en ce que chaque mutation est du type permettant d'introduire un codon identique dans chaque oligonucléotide ou un codon correspondant au même acide aminé, en substitution du codon original du gène cible. Avantageusement, ledit codon correspond à un acide aminé choisi dans le groupe comprenant Ala, Val, Gly, Leu, Ile.
25

Le procédé de l'invention peut être décrit plus précisément à l'aide des étapes suivantes :
30

- On prépare la matrice, de préférence un plasmide contenant le fragment d'ADN à muter.

- On synthétise les oligonucléotides mutants différents de préférence entre 5 et 10⁶, et plus préférentiellement entre 50 et 500, puis à mélanger
35

l'ensemble des oligonucléotides mutants. La concentration finale de chacun des oligonucléotides dans le mélange est ainsi divisée lors de cette étape par le nombre d'oligonucléotides.

5 - On ajoute à la matrice, c'est-à-dire au plasmide contenant le fragment d'ADN à muter, à une concentration telle que le rapport entre le nombre de molécules de matrice et le nombre de molécules de chacun des oligonucléotides mutants soit compris entre 0,01 et 100, et
10 de préférence entre 0,1 et 10.

 - On dénature la matrice par la chaleur (environ 95°C), de façon à disposer temporairement d'ADN simple brin. Lors du retour à une température plus basse, certains ou tous les oligonucléotides présents dans le mélange se fixent
15 sur la matrice au niveau de leur site d'homologie.

 - On ajoute tous les éléments nécessaires à réaliser une réplication de la matrice à partir des oligonucléotides mutants, et notamment une polymérase, le
20 tampon permettant son activité, des nucléotides triphosphates en quantité suffisante, les éventuels cofacteurs nécessaires. La réaction de réplication a ensuite lieu dans les conditions de température correspondant à l'activité maximale de la polymérase. Éventuellement, une ligase peut être ajoutée lors de l'étape de réplication, de
25 façon à ce que les brins d'ADN néosynthétisés se liguent au niveau de l'extrémité 5' d'un autre oligonucléotide, lié sur la matrice en 3' du premier. Dans ce cas, les oligonucléotides sont préalablement phosphorylés.

 - Éventuellement, on répète les étapes de
30 dénaturation et de réplication plusieurs fois. Dans ce cas, il est préférable que la polymérase soit thermostable, afin d'éviter la nécessité de rajouter de l'enzyme à chaque cycle. A l'issue de cette réaction, les molécules d'ADN présentes dans le mélange sont de plusieurs types :

35 - d'une part, il reste de la matrice initiale double brin n'ayant pas été efficacement répliquée,

- d'autre part, une partie des molécules a été répliquée, c'est-à-dire qu'elles contiennent un brin d'origine et un brin néosynthétisé à partir d'une ou de plusieurs amorces que constituent les oligonucléotides mutants.

- On soumet le mélange obtenu à la digestion par l'enzyme DpnI, ou une autre enzyme de restriction permettant de supprimer les molécules d'ADN méthylés sur les deux brins et de conserver celles qui ne sont pas méthylés ou hémiméthylés.

- On transforme des bactéries compétentes par le mélange précédent, ces bactéries sont ensuite étalées sur un milieu contenant un agent sélectif de façon à sélectionner les bactéries ayant intégré un plasmide. Les molécules d'ADN qui ont été clivées à l'étape précédente sont éliminées car la présence d'un plasmide circulaire complet est indispensable à la survie de la bactérie en milieu sélectif.

- On prélève individuellement les colonies bactériennes obtenues et on les utilise pour ensemençer un milieu nutritif sélectif. Une préparation d'ADN plasmidique de ces cultures est ensuite réalisée afin d'isoler une grande quantité d'ADN plasmidique potentiellement mutant. Un examen des différentes molécules d'ADN plasmidiques à ce stade permet de calculer le taux moyen d'incorporation de chaque oligonucléotide, et de vérifier que celui-ci est voisin de la valeur recherchée (généralement 1/N).

- Éventuellement, on teste l'activité biologique correspondant aux différents lots de préparations plasmidiques mutantes. L'activité mesurée peut être supérieure à celle du fragment non muté, égale, ou inférieure. Dans le cas où l'activité est modifiée, le plasmide correspondant est séquencé de façon à pouvoir localiser la position de la mutation introduite. Dans un mode de réalisation préféré, on teste l'activité biologique correspondant aux molécules mutantes, et on compare cette mesure à celle de l'activité biologique correspondant à la molécule d'ADN plasmidique non mutée. Lorsque l'observation

de ces mesures fait apparaître une différence significative, les molécules mutantes sont séquencées afin de mettre en évidence la position de la mutation à l'origine de cette modification d'activité. L'ordre de ces deux dernières étapes est inversé par rapport aux techniques habituelles de mutagenèse dirigée, qui impliquent généralement l'obtention et la vérification de la molécule mutante préalablement au test de son activité biologique.

Ainsi, une forme de réalisation du procédé de mutagenèse selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a) on prépare une matrice constituée d'un plasmide contenant le gène cible et un gène de résistance,

b) on prépare une série équimoléculaire d'oligonucléotides présentant une séquence complémentaire d'une région différente du gène cible et au moins une mutation placée au centre de la séquence de l'oligonucléotide, l'ensemble des oligonucléotides de la série couvrant tout ou partie de la séquence dudit gène cible,

c) on mélange la série d'oligonucléotides préparée à l'étape (b) avec le plasmide de l'étape (a) selon un rapport molaire de chaque oligonucléotide par rapport au plasmide compris entre 0,01 et 100 et de préférence entre 0,1 et 10,

d) on dénature le mélange de l'étape (c) par la température de façon à obtenir une matrice simple brin,

e) on le mélange de l'étape (d) à une température permettant l'hybridation des oligonucléotides sur la matrice,

f) on ajoute au mélange au moins une polymérase, son tampon et ses cofacteurs, et une quantité suffisante de chacun des nucléotides triphosphates, pour permettre la réplique des brins de la matrice à partir de n'importe lequel des oligonucléotides,

g) éventuellement on répète les étapes (d), (e) et (f),

h) on sélectionne par tout moyen approprié les produits de l'étape (f) ou (g) ayant subi la répllication,

5 i) on transforme les produits sélectionnés à l'étape (h) dans des bactéries compétentes, et l'on sélectionne les produits portant un plasmide sur un milieu sélectif correspondant à un gène de résistance porté par le plasmide de l'étape (a).

10 Avantageusement, l'étape (h) ci-dessus consiste à soumettre les produits de l'étape (f) à l'action d'une enzyme de restriction sélectionnant les produits ayant subi la répllication, comme l'enzyme DpnI.

15 Les oligonucléotides peuvent être phosphorylés à leur extrémité 5' lorsqu'à l'étape (f) on ajoute une ligase, avantageusement une ligase thermostable.

20 Le procédé de mutagenèse selon l'invention est particulièrement utile pour mesurer l'activité biologique des protéines mutées codées par les gènes cibles mutés. En conséquence, le gène cible est une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine d'intérêt avec ou sans ses propres séquences de régulation. Si le gène cible ne comprend pas les séquences de régulation, comme un promoteur, celles-ci sont présentes au niveau du plasmide.

25 L'invention concerne donc aussi un procédé de mutagenèse d'une protéine cible, caractérisé en ce qu'il comprend la préparation d'une banque d'expression de gènes mutés à partir d'un gène cible codant pour ladite protéine selon le procédé de mutagenèse décrit précédemment, puis l'expression desdits gènes mutés pour produire une banque de protéines mutées, et éventuellement le criblage desdites protéines mutées pour une fonction désirée, avantageusement par rapport à la protéine cible.

30 L'invention permet donc la réalisation d'un procédé de sélection de protéines mutées présentant une

activité modifiée par rapport à la même protéine non mutée, ou du gène muté correspondant à ladite protéine mutée, comprenant un procédé de mutagenèse ci-dessus, puis après le criblage desdites protéines mutées pour une fonction
5 désirée, avantageusement par rapport à la protéine cible, la sélection de la protéine mutée présentant la fonction désirée, et éventuellement le séquençage du gène muté correspondant à ladite protéine mutée.

Ces procédés de mutagenèse d'une protéine cible ou de sélection d'une protéine mutée ou du gène
10 correspondant selon l'invention sont caractérisés en ce qu'ils comprennent la préparation d'une banque d'expression de gènes mutés à partir d'un gène cible codant pour ladite protéine, puis les étapes suivantes :

j) on incube le milieu sélectif à la température adéquate pendant le temps suffisant à la pousse de colonies bactériennes individuelles,

k) on ensemence des cultures de bactéries individuelles à partir des colonies de l'étape (j),

20 l) on effectue des préparations d'ADN plasmidique des cultures de l'étape (k),

m) on mesure l'activité biologique associée à chaque préparation d'ADN plasmidique de l'étape (l) et on compare le résultat obtenu par rapport à celui mesuré en
25 utilisant l'ADN plasmidique non muté.

n) éventuellement, on séquence les préparations d'ADN plasmidique ayant permis d'observer des modifications significatives de l'activité biologique.

30 L'invention a également pour objet une série d'oligonucléotides mutés par rapport à un gène cible comme défini précédemment.

L'invention a encore pour objet une banque de
35 gènes mutés susceptibles d'être obtenue par un procédé décrit précédemment caractérisée en ce que chaque mutation différente est présente en moyenne dans moins de 1/5 des

gènes de la banque et de préférence en moyenne dans environ 1/N des gènes de la banque, avec N supérieur à 5, de préférence avec N compris entre environ 5 et 10^6 et tout préférentiellement avec N compris entre 50 et 500. De préférence, cette banque est obtenue, conformément au procédé de l'invention, grâce à la mise en œuvre de N oligonucléotides avec N supérieur à 5, de préférence avec N compris entre environ 5 et 10^6 et tout préférentiellement avec N compris entre 50 et 500.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent donnés à titre non limitatif et des dessins en annexe dans lesquels :

La figure 1 représente une répartition des oligonucléotides mutants sur la séquence de la molécule CD4. Chacun des oligonucléotides contient trois mutations au maximum, représentées ici par la brisure de la ligne de la flèche, localisées en son centre, destinées à changer le codon visé en Alanine. Les oligonucléotides se chevauchent les uns les autres, et sont représentés ici sur trois niveaux par mesure de clarté. Dans l'exemple de la figure 1, 24 oligonucléotides mutants seulement sont représentés. Dans l'exemple 1 ci-après, 95 oligonucléotides ont été utilisés simultanément. Dans cet exemple, les oligonucléotides portant les mutations sont tous de même orientation.

La figure 2 est un résumé schématique des étapes du procédé de mutagenèse selon l'invention à partir des oligonucléotides mutants de la figure 1. Les mutations dans les molécules d'ADN sont représentées par une barre verticale. Les lettres signifient :

- (a) polymérisation (polymérase, dNTP, Tampon et cofacteurs) ;
- (b) digestion par DpnI pour éliminer les matrices initiales ;
- (c) transformation de bactéries compétentes puis étalement sur milieu sélectif ;

- (d) ensemencement de cultures bactériennes à partir des colonies isolées puis préparation d'ADN plasmidique.

- (e) test phénotypique puis sélection et séquençage des mutants ayant le phénotype recherché.

La figure 3 représente un exemple de construction d'oligonucléotides mutants à partir de demi-oligonucléotides comprenant une ligation par la T4 ligase.

La figure 4 donne des exemples de représentation schématique des oligonucléotides contenant des bases dégénérées au niveau des points de mutation. La lettre N signifie que n'importe laquelle des 4 bases peut être présente à ce endroit. Ainsi l'oligonucléotide concerné est en réalité constitué d'un mélange de 4^N espèces moléculaires.

Exemple 1 : Alanine Scanning.

Un gène codant pour la molécule CD4 a été introduit dans le vecteur SK+. Les 95 premiers codons de ce gène ont été la cible d'une réaction de mutagenèse massive selon la technique de l'invention.

Pour ce faire, une série de 95 oligonucléotides de 21 bases ont été synthétisés. Chacun de ces oligonucléotides était complémentaire d'une séquence du gène CD4 centrée sur un codon. Ainsi, le premier oligonucléotide était homologue d'une séquence centrée sur le codon 1. Il était parfaitement homologue à 9 bases de chaque côté dudit codon, et contenait 3 mutations, destinées à transformer le premier codon en codon Alanine (Figure 1).

De même, le second oligonucléotide était centré sur le second codon et contenait trois mutations adjacentes en son milieu.

Les 95 oligonucléotides, chevauchants entre eux et tous de même orientation, étaient ensuite mélangés de façon équimolaire et phosphorylés en utilisant le kinase de T4 dans des conditions standards d'utilisation.

La réaction suivante a ensuite été réalisée :

Matrice SK-CD4 (250 µg/ µl) :

1 µl

	MIX des 95 oligonucléotides 5'P (0,5 μ M chacun)	2 μ l
	dNTP Triphosphates (2,5 mM)	10 μ l
	Tampon 10X de Pfu Polymérase	2,5 μ l
	ATP 10 mM	0,5 μ l
5	Pfu Polymérase (2,5 U / μ l)	1 μ l
	Pfu Ligase (4 U / μ l)	1 μ l
	H ₂ O	7 μ l
	Total	<hr/> 25 μ l

10

Lé mélange a été soumis à une réaction de 12 cycles de température [(94°C, 1') ; (35°C, 1') ; (68°C, 20')].

15

Le mélange réactionnel a ensuite été soumis à une digestion par 5 unités de l'enzyme DpnI dans des conditions de tampon adaptées, pendant 30' à 37°C.

20

Des bactéries compétentes ont été transformées par ce mélange en utilisant un protocole de choc thermique, et étalées sur une boîte de pétri contenant l'agent sélectif.

Le lendemain, un millier de bactéries étaient obtenues.

Un schéma résumant les étapes de la technique est proposé en figure 2.

25

A ce stade, un test statistique de quelques molécules d'ADN de la banque a été réalisé pour mesurer le taux d'intégration des mutations, c'est-à-dire le remplacement d'un des 95 codons par un codon Alanine. Cet examen révélait que la fréquence d'incorporation de chaque oligonucléotide était voisine de 1%, ce qui était dans ce

30

cas la valeur recherchée (1/N avec N=95). Les molécules mutantes ont ensuite été amplifiées par culture bactérienne et préparation d'ADN plasmidique. Chacun des lots d'ADN plasmidique, correspondant à un type unique de molécule mutante, a été

35

utilisé pour transfecter des cellules eucaryotes, et celles-ci ont été testées pour le maintien ou la perte des épitopes

portés par la molécule CD4, cette activité étant mesurée par la liaison d'un anticorps anti-CD4.

5 Exemple 2 : Valine scanning en utilisant la reconstruction des oligonucléotides reconstruits à partir de demi oligonucléotides.

10 Une série de 11 oligonucléotides ont été chacun reconstruits à partir de deux demi-oligonucléotides double brin. La ligation des deux demi-oligonucléotides a été effectuée par une réaction utilisant la T4 ligase. Seul un des deux demi-oligonucléotides étant phosphorylé au niveau d'une de ses extrémités 5', cette réaction avait pour effet de permettre l'obtention d'un seul oligonucléotide complet, composé de 18 bases (8 de chaque côté parfaitement homologues, et deux en son milieu invariablement constituées des nucléotides GT (figure 3).

15 Ces mutations, destinées à remplacer les deux premiers nucléotides de n'importe quel codon, permettent de remplacer ce codon par un codon Valine. En effet, le code génétique étant dégénéré, les codons valine peuvent s'écrire sous la forme GTN, où N représente n'importe laquelle des quatre bases.

20 Une fois obtenus ces 11 oligonucléotides reconstruits, homologues de 11 régions distinctes de la molécule CD4, mais portant la même mutation (changement en Valine), par ailleurs orientés dans le même sens, le protocole était identique à celui exposé dans l'exemple 1.

25 Il était recherché une fréquence moyenne d'incorporation des oligonucléotides mutants d'environ 9% (1/11) dans cet exemple.

30 Exemple 3 : Amélioration d'un site actif par mutagenèse massive à saturation.

35 Une fois connus les acides aminés prenant part directement au site actif d'une protéine, par exemple grâce à des données de mutagenèse massive telle que présentée dans les exemple précédents, ces acides aminés peuvent être

soumis à une mutagenèse massive à saturation, c'est-à-dire visant à introduire un grand nombre de codons différents en remplacement d'un codon particulier. Ainsi, 6 codons du gène codant pour la protéine agaB, enzyme impliquée dans la synthèse des sucres, étaient identifiés comme prenant part directement à l'activité de l'enzyme.

Six oligonucléotides centrés sur ces codons étaient synthétisés. De chaque côté, ils étaient totalement homologue à 9 bases de la séquence. Au niveau des deux premiers nucléotides des codons à muter, la séquence sauvage était remplacée par la séquence NN (figure 4). De cette façon, chacun des 6 codons pouvait être remplacé par différents codons spécifiques d'autres acides aminés.

Une fois obtenus ces oligonucléotides, la réaction de mutagenèse massive était identique à celle décrite dans l'exemple 1.

Il était recherché une fréquence moyenne d'incorporation des oligonucléotides mutants d'environ 17% (1/6) dans cet exemple.

Ces molécules d'ADN plasmidique étaient destinées à être criblées de façon à mesurer une augmentation de l'activité de l'enzyme.

Cet exemple, bien que n'utilisant qu'un nombre réduit d'oligonucléotides mutants contenant des bases dégénérées, démontre la faisabilité de l'adaptation de la technique de l'invention à la mutagenèse de nature aléatoire (changement d'un codon en un grand nombre d'autres codons) mais de positions déterminées.

Exemple 4 : Optimisation des codons d'un gène.

Les gènes contiennent généralement des codons qui sont défavorables à l'expression des protéines pour lesquelles ils codent. Ces codons défavorables peuvent être vus comme un mécanisme de régulation de l'expression d'un gène. Ces codons défavorables sont relativement bien identifiés, et il peut être nécessaire de les modifier en un

codon plus favorable à l'expression de la protéine mais n'induisant pas de changement d'acide aminé.

En règle générale, environ 5 % des codons d'un gène sont défavorables, et limitent le niveau d'expression de la protéine correspondante. La modification de ces codons peut permettre d'obtenir de meilleurs niveaux d'expression du gène lors de la production *in vitro* de la protéine correspondante.

Pour autant, la modification simultanée de tous les codons ne permet pas d'obtenir cette amélioration de niveau d'expression, probablement à cause de la déstabilisation générale de la séquence par un trop grand nombre de modifications.

Les meilleurs niveaux d'expression sont le plus souvent obtenus lorsqu'une partie seulement des codons défavorables sont modifiés.

Dans ce cas, une banque de mutations portant sur ces codons défavorables peut être réalisée en utilisant la technique de l'invention, et les molécules mutantes présentant les meilleurs taux d'expression sont alors sélectionnées. Pour ce faire, un oligonucléotide mutant doit être synthétisé pour chaque codon défavorable, les mutations portées par ces oligonucléotides étant définies par le fait qu'elles changent un codon défavorable à l'expression en codon lui étant favorable, sans changer la séquence primaire de la protéine correspondante.

Dans ce contexte, la fréquence moyenne d'incorporation des oligonucléotides mutants peut être recherchée dans une fourchette relativement large, par exemple entre 1 et 20 %. En effet, le nombre de mutations simultanées permettant d'obtenir le meilleur niveau d'expression n'est pas connu. Dans ce contexte, plusieurs banques correspondant à des fréquences d'incorporation différentes peuvent être réalisées.

Le procédé est similaire à celui présenté dans l'exemple 1. Les molécules mutantes sont ensuite criblées sur le critère de leur niveau d'expression : les molécules

présentant les meilleurs niveaux d'expression sont
sélectionnées.

REVENDEICATIONS

5 1) Procédé de mutagenèse d'un gène cible consistant à préparer une série de N oligonucléotides de séquence substantiellement complémentaire d'au moins une région du gène cible, avec N supérieur à 5, puis à faire réagir ladite série d'oligonucléotides avec ledit gène cible dans des conditions permettant la production de copies du gène cible portant au moins une mutation, caractérisé en ce
10 que chaque oligonucléotide présente une séquence complémentaire d'une région différente du gène cible et au moins une mutation placée au centre de la séquence de l'oligonucléotide, l'ensemble desdits oligonucléotides de la série couvrant tout ou partie de la séquence dudit gène
15 cible, et en ce que l'on fait réagir ladite série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase de façon à générer une banque de gènes mutés où chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente en moyenne dans moins de $1/5$ des gènes de la
20 banque.

2) Procédé de mutagenèse selon la revendication 1, caractérisé en ce que N est compris entre environ 5 et 10^6 et de préférence entre 50 et 500, et en ce que chaque
25 mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente en moyenne dans entre $1/5$ et $1/10^6$ et de préférence entre $1/50$ et $1/500$ des gènes de la banque.

3) Procédé de mutagenèse selon l'une des
30 revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la série d'oligonucléotides comprend N oligonucléotides différents et en ce que chaque mutation provenant d'un oligonucléotide différent est présente dans en moyenne environ $1/N$ des gènes de la banque.

35 4) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ce que l'on

fait réagir la série d'oligonucléotides avec le gène cible selon un rapport molaire de chaque oligonucléotide par rapport au gène cible compris entre 0,01 et 100 et de préférence entre 0,1 et 10.

5

5) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ce que l'on fait réagir la série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase ayant une activité de déplacement de brin comme la Pfu polymérase ou une activité 5' exonucléasique comme la Taq polymérase.

10

6) Procédé de mutagenèse selon la revendication 5, caractérisé en ce que ce que l'on fait réagir la série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase ayant une activité de déplacement de brin ou d'activité 5' exonucléasique et une ligase.

15

7) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ce que l'on fait réagir la série d'oligonucléotides avec le gène cible en présence d'une polymérase n'ayant pas d'activité de déplacement de brin ou d'activité 5' exonucléasique, comme la T4 polymérase, et en l'absence de ligase.

20

25

8) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les oligonucléotides de la série sont chevauchants ou non et présente une taille comprise entre 10 et 100 et de préférence entre 15 et 25 nucléotides.

30

9) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que chaque oligonucléotide comprend 1 ou plus mutation(s) et de préférence de 1 à 3 mutation(s) placée(s) au centre de sa séquence.

35

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les mutations de chaque oligonucléotide sont choisis parmi des délétions et ou des insertions de un ou plusieurs nucléotide(s).

11) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que chaque oligonucléotide de la série est présent en plusieurs exemplaires chaque exemplaire possédant un nucléotide différent au niveau de la ou desdites mutation(s).

12) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que chaque mutation est du type permettant d'introduire un codon identique dans chaque oligonucléotide ou un codon correspondant au même acide aminé, en substitution du codon original du gène cible.

13) Procédé de mutagenèse selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit codon correspond à un acide aminé choisi dans le groupe comprenant Ala, Val, Gly, Leu, Ile.

14) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) on prépare une matrice constituée d'un plasmide contenant le gène cible et un gène de résistance,

b) on prépare une série équimoléculaire d'oligonucléotides présentant une séquence complémentaire d'une région différente du gène cible et au moins une mutation placée au centre de la séquence de l'oligonucléotide, l'ensemble des oligonucléotides de la série couvrant tout ou partie de la séquence dudit gène cible,

c) on mélange la série d'oligonucléotides préparer à l'étape (b) avec le plasmide de l'étape (a) selon un rapport molaire de chaque oligonucléotide par rapport au plasmide compris entre 0,01 et 100 et de préférence entre 0,1 et 10,

d) on dénature le mélange de l'étape (c) par la température de façon à obtenir une matrice simple brin,

e) on le mélange de l'étape (d) à une température permettant l'hybridation des oligonucléotides sur la matrice,

f) on ajoute au mélange au moins une polymérase, son tampon et ses cofacteurs, et une quantité suffisante de chacun des nucléotides triphosphates, pour permettre la réplication des brins de la matrice à partir de n'importe lequel des oligonucléotides,

g) éventuellement on répète les étapes (d), (e) et (f),

h) on sélectionne par tout moyen approprié les produits de l'étape (f) ou (g) ayant subi la réplication,

i) on transforme les produits sélectionnés à l'étape (h) dans des bactéries compétentes, et l'on sélectionne les produits portant un gène muté sur un milieu sélectif correspondant à un gène de résistance porté par le plasmide de l'étape (a).

15) Procédé de mutagenèse selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'étape (h) consiste à soumettre les produits de l'étape (f) à l'action d'une enzyme de restriction sélectionnant les produits ayant subi la réplication.

16) Procédé de mutagenèse selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'enzyme de restriction sélectionnant les produits ayant subi la réplication est l'enzyme DpnI.

17) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce que les oligonucléotides sont phosphorylés à leur extrémité 5' et en ce qu'à l'étape (f) on ajoute une ligase, avantageusement une ligase thermostable.

18) Procédé de mutagenèse selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène cible est une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine d'intérêt avec ou sans ses propres séquences de régulation.

19) Procédé de mutagenèse d'une protéine cible, caractérisé en ce qu'il comprend la préparation d'une banque d'expression de gènes mutés à partir d'un gène cible codant pour ladite protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, puis en ce que l'on exprime lesdits gènes mutés pour produire une banque de protéines mutées, et éventuellement en ce que l'on crible lesdites protéines mutées pour une fonction désirée, avantageusement par rapport à la protéine cible.

20) Procédé de sélection de protéines mutées présentant une activité modifiée par rapport à la même protéine non mutée, ou du gène muté correspondant à ladite protéine mutée, caractérisé en ce qu'il comprend un procédé de mutagenèse selon la revendication 19, en ce qu'après le criblage desdites protéines mutées pour une fonction désirée, avantageusement par rapport à la protéine cible, on sélectionne la protéine mutée présentant la fonction désirée, et éventuellement on séquence le gène muté correspondant à ladite protéine mutée.

21) Procédé de mutagenèse d'une protéine cible selon la revendication 19 ou de sélection d'une protéine mutée ou du gène correspondant selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend la préparation d'une banque

d'expression de gènes mutés à partir d'un gène cible codant pour ladite protéine selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce qu'il comprend après l'étape (i), les étapes suivantes :

5 j) on incube le milieu sélectif à la température adéquate pendant le temps suffisant à la pousse de colonies bactériennes individuelles,

 k) on ensemence des cultures de bactéries individuelles à partir des colonies de l'étape (j),

10 l) on effectue des préparations d'ADN plasmidique des cultures de l'étape (k),

 m) on mesure l'activité biologique associée à chaque préparation d'ADN plasmidique de l'étape (l) et on compare le résultat obtenu par rapport à celui mesuré en
15 utilisant l'ADN plasmidique non muté.

 n) éventuellement, on séquence les préparations d'ADN plasmidique ayant permis d'observer des modifications significatives de l'activité biologique.

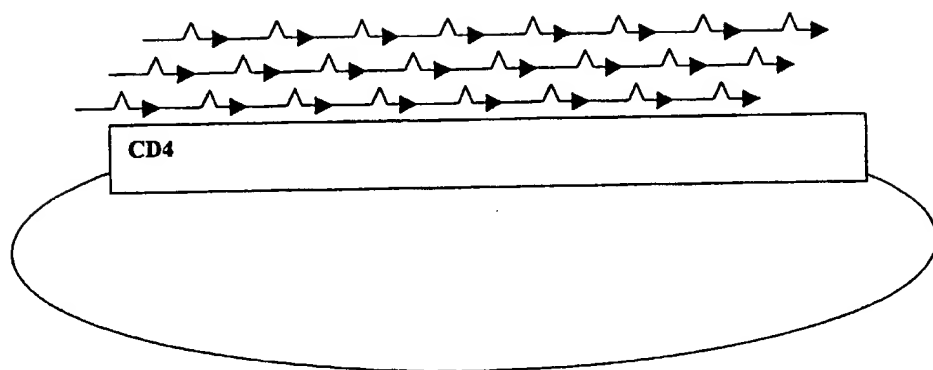
20 22) Une série d'oligonucléotides mutés par rapport à un gène cible comme défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 18.

25 23) Une banque de gènes mutés obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que chaque mutation différente est présente en moyenne dans plus de $1/N$ des gènes de la banque, avec N supérieur à 5, de préférence avec N compris entre environ 5 et 10^6 et tout préférentiellement avec N compris
30 entre 50 et 500.

35

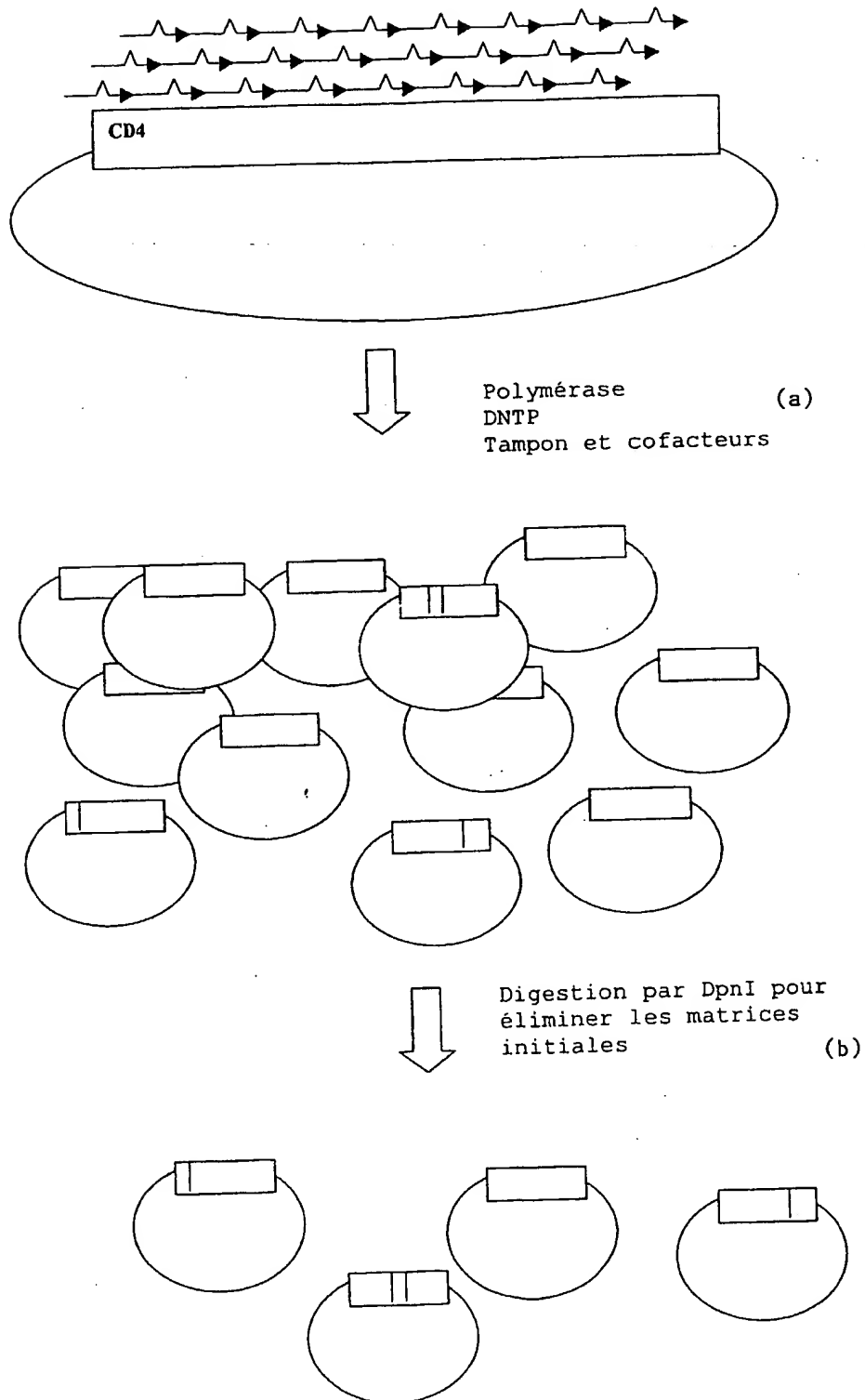
1/5

Fig.1



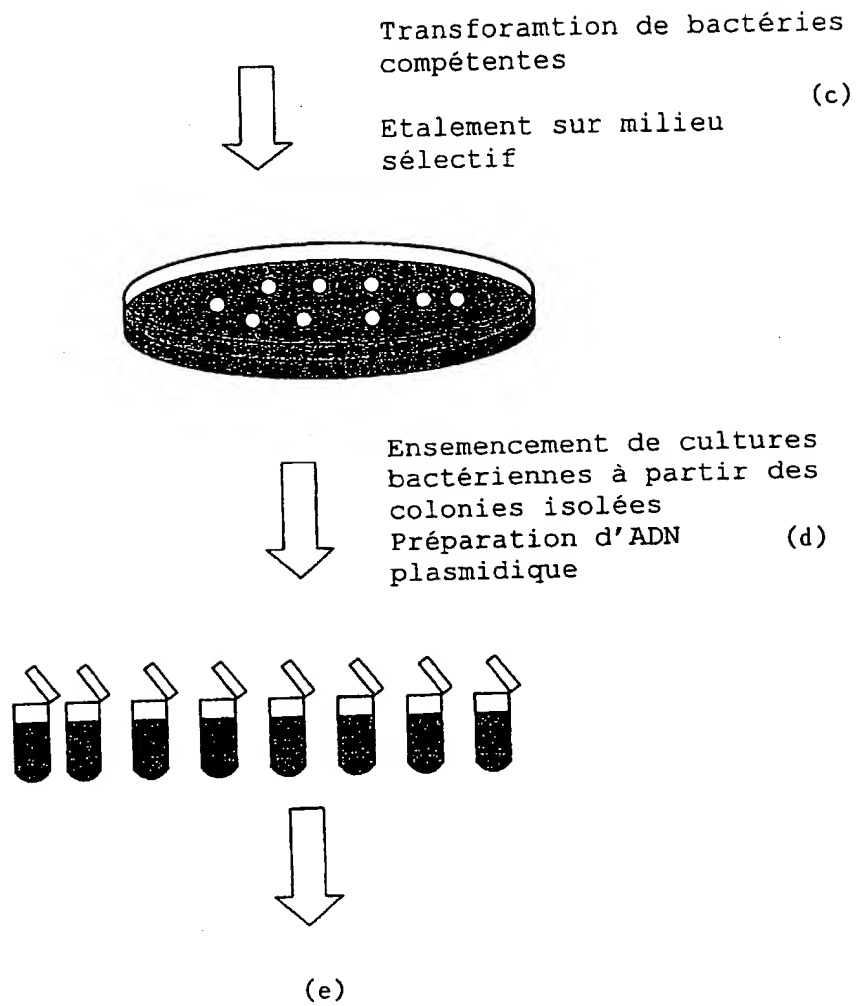
2/5

Fig.2



3/5

Fig.2(suite)



Test phénotypique.
Sélection et séquençage des mutants ayant
le phénotype recherché.

4/5

Fig.3

XXXXXXX PGTXXXXXXX
XXXXXXXCA XXXXXXXX



Ligation par la T4 ligase

XXXXXXXXGTXXXXXXXX
XXXXXXXXCA XXXXXXXX

5/5

Fig.4

CCGTGTGATNACGTGCAGA

4 espèces moléculaires

ATCGATAGGNNAGAGTCTTA

16 espèces moléculaires

ATGGGATGANNNAGTTCGATG

64 espèces moléculaires



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2813314

N° d'enregistrement
nationalFA 596842
FR 0010962

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 798 208 A (CREA ROBERTO) 25 août 1998 (1998-08-25) * colonne 4 * * colonne 7 - colonne 8 * ---	1-23	C12N15/01 C12N15/11 C07H21/00 C12Q1/68
X	XIAO, G. ET AL.: "Construction and screening of a multi-point site-specific mutant library of subtilisin E with a set of oligonucleotides" SCIENCE IN CHINA, SERIES C: LIFE SCIENCES, vol. 40, no. 4, 1997, pages 337-344, XP000993443 * page 338, dernier alinéa * * page 342, alinéa 2 * -----	1-4, 8-14, 17-23	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
11 mai 2001		Mata Vicente, T.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)